

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト ⁸ (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	X 2 G 0 4 j
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	Y
33/569		33/569	F

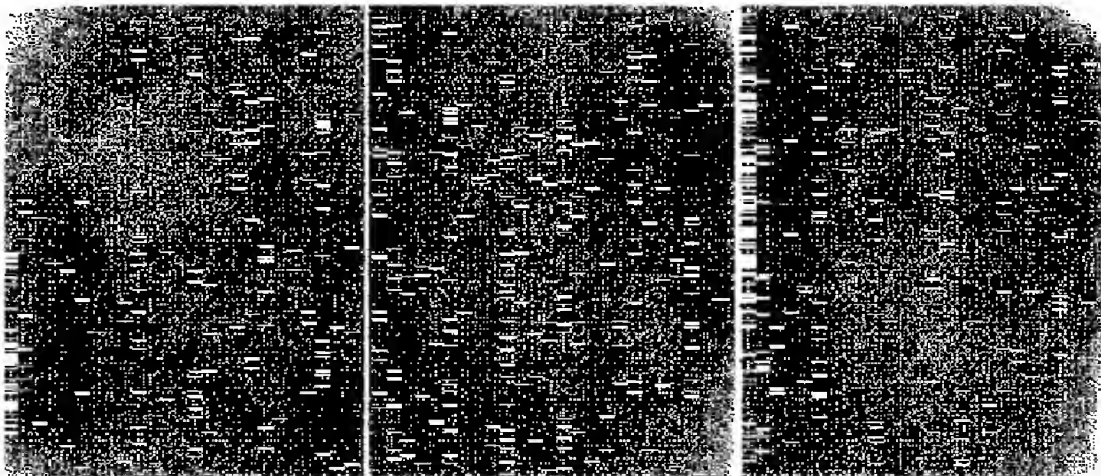
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2001－157574 (P2001－157574)	(71) 出願人	500324222 株式会社日本生物科学センター 大阪府大阪市北区豊崎四丁目12－17
(22) 出願日	平成13年 5 月25日 (2001. 5. 25)	(71) 出願人	59203/055 株式会社日本医学臨床検査研究所 京都府久世郡久御山町大字大橋辺小字大橋 辺16番地10
特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成13年 3 月15日 日本結核病学会発行の「結核 第76巻 第 3 号 (3 月 号) 」に発表		(74) 代理人	10010/308 弁理士 北村 修一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 喀痰中の原因菌の消化断片を利用した呼吸器感染症の診断方法

(57) 【要約】
【課題】 本発明は、医療の現場で切望されている、結核をはじめとする呼吸器感染症の原因菌を迅速かつ簡便で、確実に検出できる免疫学的検出方法を確立することを目的とする。
【解決手段】 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、従来の方が着目していなかった病原菌の消化断片の存在に注目し、この呼吸器感染症患者の喀痰中に多く含まれる消化断片を同定することにより、従来の方がなしえなかった、簡便で迅速かつ確実に呼吸器感染症の原因菌を検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。



【特許請求の範囲】

【請求項1】呼吸器感染症の原因菌検出方法であって、被検者から採取された喀痰と呼吸器感染症の原因となる病原菌を認識する抗体とを接触させて免疫複合体を形成させ、喀痰中に含まれる前記呼吸器感染症の原因となる病原菌の未消化の完全な菌体のみならず消化された菌体断片をも検出することを特徴とする呼吸器感染症の原因菌検出方法。

【請求項2】前記抗体が、呼吸器感染症の原因となる病原菌を認識するポリクローナル抗体、もしくは、呼吸器感染症の原因となる病原菌の異なる構成成分をエピトープとして認識するモノクローナル抗体を多数組み合わせたカクテル抗体である、請求項1に記載の呼吸器感染症の原因菌検出方法。

【請求項3】前記呼吸器感染症が、結核である請求項1～2のいずれかに記載の呼吸器感染症の原因菌検出方法。

【請求項4】前記抗体が、金コロイドで修飾された抗体であり、形成された免疫複合体に銀増感処理を施すことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の呼吸器感染症の原因菌検出方法。

【請求項5】呼吸器感染症の原因となる病原菌を認識するポリクローナル抗体、もしくは、呼吸器感染症の原因となる病原菌の異なる構成成分をエピトープとして認識するモノクローナル抗体を多数組み合わせたカクテル抗体を含有する、喀痰中に含まれる前記呼吸器感染症の原因となる病原菌の未消化の完全な菌体のみならず消化された菌体断片をも検出するための呼吸器感染症の診断キット。

【請求項6】前記抗体が、金コロイドで修飾された抗体であることを特徴とする、請求項5に記載の呼吸器感染症の診断キット。

【請求項7】更に、銀増感手段を有する請求項6に記載の呼吸器感染症の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、結核をはじめ、あらゆる呼吸器感染症を診断する簡便かつ迅速で、確実な呼吸器感染症の原因となる病原菌を検出するための免疫学的検出方法および免疫学的検出キットに関する。

【0002】

【従来の技術】近年、再興感染症として流行している結核は、呼吸器感染症の中で最も死亡数の多い疾患であり、最近のWHOの統計によると、世界的には年間で300万人近い患者が死亡している。日本においても年間3万人近い患者が死亡し、厚生省より平成11年7月26日に結核緊急事態宣言が出された。この結核症において、全身のほとんど全ての組織や器官が結核菌の罹患部位となるが、特に肺に多く見られる。肺結核の患者は咳嗽などで常に空気中に菌自体を排出しており、診断の遅れが感

染の広がりを助長することになる。

【0003】これらの呼吸器感染症に対して、合理的かつ有効な治療を行なうためには、迅速かつ確実に呼吸器感染症の原因となる病原菌を同定し、適切な治療法を選択することが必要である。

【0004】ここで、生体に侵入した病原菌はマクロファージに貪食消化されるため、生体内から排泄される際に破壊されず完全な菌体として残るのは、ごくわずかである。したがって、喀痰ともに排出された菌体の多くは完全な菌体ではなく、その消化された菌体断片である。しかしながら、現在の呼吸器感染症の原因菌検出方法は、未消化な完全な菌体の染色同定、及び、生菌の培養が主流であり、最近では菌固有の核酸遺伝子をターゲットにしてPCR増幅する方向で検討されており、消化された菌体断片には目を向けられていないのが現状である。

【0005】例えば、結核の診断を例にとると、被検者の喀痰試料中に含まれる結核菌をZiehl-Neelsen染色で同定する方法（チールーネールゼン染色法）、培養により結核菌を検出する方法（培養法）、PCR法等により結核菌を検出する方法により行われていた。

【0006】チールーネールゼン染色法は、フクシンで染色する方法であり、塩酸アルコールで脱色しても抗酸菌に取り込まれたフクシンが赤色に染まることで診断するものである。しかしながら、固い脂質細胞壁で被われた完全な菌体しか染色できず、喀痰中に含まれる消化された菌断片を見逃すことになる。そのため、35%以下と検出率が低く、多くの排菌患者を見逃す結果となっており、確実性に欠けるという問題がある。

【0007】また、培養法による結核菌の培養は通常、小川培地を用いて検体を4～8週間培養し、更に検出菌の同定を行って、結核菌を確定するものである。しかしながら、結果の判定までに長時間要し、迅速性に欠けるため、結核の確定診断および早期の治療に大きな障害となっており、さらに、この判定までの間の排菌による周囲の人への感染が大きな問題となっている。

【0008】また、PCR法による検出は、結核菌遺伝子の特定領域を増幅可能な核酸プライマーを用いて結核菌を検出する結核菌の核酸遺伝子をターゲットとした検査法である。しかしながら、培養を取り入れない喀痰サンプルから判定した場合には精度に問題を残すため、偽陰性を示すケースも少なくない。さらに増幅法という性質上、微量サンプルの混入に伴う偽陽性が起こりうることで判定における信頼性に問題があり、設備投資においても簡便な方法とはいえない。

【0009】上記した結核診断の例でも明らかなように、呼吸器感染症の診断法には消化された菌体断片を利用する方法は報告されておらず、また、従来法にはそれぞれ解決すべき問題が残されている。結核をはじめとする呼吸器感染症を迅速かつ簡便で、確実に検出できる診

断方法はいまだなく、かかる診断方法の確立が医療の現場から切望されている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明は、医療の現場で切望されている、結核をはじめとする呼吸器感染症の原因菌を迅速かつ簡便で、確実に検出できる免疫学的検出方法を確立することを目的とする。

【0011】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、従来の方法が着目していなかった病原菌の消化断片の存在に注目し、この呼吸器感染症患者の喀痰中に多く含まれる消化断片を同定することにより、従来の方法がなしえなかった、簡便で迅速かつ確実に呼吸器感染症の原因となる病原菌を検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明によれば、被検者から採取された喀痰と呼吸器感染症の原因となる病原菌を認識する抗体とを接触させて免疫複合体を形成させ、喀痰中に含まれる前記呼吸器感染症の原因となる病原菌の未消化の完全な菌体のみならず消化された菌体断片を検出することをも特徴とする呼吸器感染症の原因菌検出方法が提供される。

【0013】本発明で使用される抗体として、呼吸器感染症の原因となる病原菌を認識するポリクローナル抗体、もしくは、呼吸器感染症の原因となる病原菌の異なる構成成分をエピトープとして認識するモノクローナル抗体を多数組み合わせたカクテル抗体が好適である。多数とは好ましくは50種類以上、更に好ましくは100種類～300種類、をいうものとする。

【0014】本発明が使用できる対象となる呼吸器感染症は、病原菌により引き起こされ呼吸器に炎症を引き起こすものであれば、特に限定はないが、特に結核に好適に使用できる。

【0015】また、本発明の呼吸器感染症の原因菌検出方法は、好ましくは、金コロイド・銀増感法を利用するものである。

【0016】更に、本発明は呼吸器感染症の原因となる病原菌を認識するポリクローナル抗体、もしくは、呼吸器感染症の原因となる病原菌の異なる構成成分をエピトープとして認識するモノクローナル抗体を多数組み合わせたカクテル抗体を含有する、喀痰中に含まれる前記病原体の未消化の完全な菌体のみならず消化された菌体断片をも検出するための呼吸器感染症の診断キットを提供するものであり、好ましくは前記抗体が、金コロイドで修飾された抗体であり、更に好ましくは、銀増感手段を有することを特徴とするものである。

【0017】喀痰とともに排出された菌体の多くは完全な菌体ではなく、その消化された断片であり、本発明は、かかる消化断片に着目することにより、結核菌をはじめとする呼吸器感染症の迅速かつ確実な診断を可能と

したものであり、臨床的価値は非常に高く、臨床的に広範囲な利用が期待される。

【0018】尚、本発明でいう消化断片とは、菌体がマクロファージに貪殖消化され、破壊された菌体断片であり、免疫原性を有する脂質、タンパク質、糖タンパク、糖タンパク等をふくむ、すべての病原菌の構成成分を含むものとする。

【0019】

【発明の実施の形態】以下、本発明で利用する抗体および呼吸器感染症の原因となる病原菌を検出するための免疫学的検出方法について詳述に説明する。

【0020】本発明で利用される抗体は、呼吸器感染症の原因となる病原菌を免疫原として得られ、該病原菌を認識できる抗体より適宜選択することができる。特に、呼吸器感染症の原因となる病原菌を認識するポリクローナル抗体を利用することが好ましく、呼吸器感染症の原因となる病原菌の異なる構成成分をエピトープとして認識するモノクローナル抗体を多数組み合わせたカクテル抗体を使用することも可能である。また、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を混合して使用することも可能である。本発明で使用できるモノクローナル抗体が認識するエピトープは病原菌を構成するいかなる抗原性物質上に存在していてもよい。

【0021】しかしながら、菌体の構成成分の中、特定の成分の一部をエピトープとして認識するモノクローナル抗体を一種類のみを単独で使用したり、わずか数種類だけ組み合わせることはできない。体内から排出される喀痰中に含まれる消化断片は、その病原菌の構成成分である蛋白、脂質、糖蛋白、糖脂質などを種々の成分で、それぞれ、異なる組成で含んでおり、これらの構成成分の中で特定の構成成分をエピトープとするモノクローナル抗体を単独で用いたり、わずか数種類だけを組み合わせることは、特定成分を含まない多くの消化断片を見逃す結果となり、不適切である。すなわち、抗体が認識するエピトープを菌体中のいずれかの構成成分に限定しないことに意義がある。

【0022】これらの抗体は市販のものを使用しても良く、また、常法に基いて作製したものを使用しても良い。これら抗体の作製方法は当該分野の当業者において良く知られており、呼吸器感染症の原因となる病原菌を免疫抗原として得られるものである。免疫抗原として利用される病原菌は完全な菌体のみならず、病原菌を構成するいかなる抗原性物質（菌体断片）であってもよく、ホモジナイズ等の手段により菌体を破碎した菌体断片であってもよいが、抗体が多くの消化断片を認識する必要があるという観点から、単一の構成成分を単離精製したものはふさわしくはない。また、菌体は、死菌体、生菌体いずれをも使用することができる。

【0023】温血動物を免疫感作するには、例えば、上記免疫抗原を温血動物の抗体が産生が可能な部位にそれ

自体あるいは、担体、希釈剤と共に投与することにより行なわれる。投与に際しては、抗体産生能を高めるべく、完全フロイントアジュバンドや不完全フロイントアジュバンドを投与してもよい。投与は通常2～6週間毎に1回ずつ、計3～10回程度行なうことができる。また、投与量は一般的に動物体重1kgあたり、1～100mgの範囲で行なうことができる。

【0024】ポリクローナル抗体は、免疫抗原で免疫した温血動物から採血し、血清を分取して得られた抗血清からIgG画分を分離精製して調整できる。分離精製は、例えば、血清からプロテインG又はプロテインAカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過法又は電気泳動法、DEAEイオン交換クロマトグラフィー等に従って、IgG画分を回収してポリクローナルIgGを得ることができる。

【0025】モノクローナル抗体は、免疫抗原で免疫した温血動物から採取された抗体産生細胞と温血動物の骨髓腫細胞等の不死化細胞との融合されることによって、融合細胞（ハイブリドーマ）を調製し、これにより、所望の免疫抗原を認識する抗体を産生する所望のハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマを培養することにより得ることができる。ハイブリドーマの作製は、例えば、Kohler and Milstein, Nature, Vol. 256, p495 (1975) に従って行なうことができ、融合促進剤としてはPEG、センダイウィルス等が挙げられる。得られるハイブリドーマの選択は通常の選択培地、例えば、HAT培地で培養することにより行なわれる。モノクローナル抗体の分離精製は、ポリクローナル抗体の分離精製と同様に行なうことができる。

【0026】また同じ属に属する菌群においては、特定の菌種の菌体と、他の菌種の菌体はそれぞれ類似する抗原を有する場合が多く、一般的に、特定の菌種の菌体に対するポリクローナル抗体を作製した場合に、類似する抗原を有する他の菌種の菌体と交差反応性を示す。そこで、特定の菌種の菌体に対する抗体を、他の菌種の菌体により吸収処理することにより、非特異的成分を除去でき、特定の菌種の菌体に特異的に反応するポリクローナル抗体を得ることができる。かかる抗体も本発明で好適に使用することができ、このような抗体を用いることにより、特定菌種に特異的な消化断片を検出できることから、菌種の鑑別診断を迅速かつ確実に行なうことが可能となる。また、非特異的成分を除去する吸収処理方法は当業者に公知である。かかる公知の何れの方法を使用することも可能であり、また、2001-72541号で記載されている菌体カラムを使用して吸収処理を行なうことも可能である。具体的には、抗体作製の目的菌体と類似の抗原を有する菌体を担持させた菌体カラムを作製し、抗体作製の目的菌体を免疫感作した動物の血清免疫グロブリン分画から得られるポリクローナル抗体を前記

カラムに通過させることによって、抗体作製の目的菌体と類似の抗原を有する菌体と反応する抗体を吸収除去し、該目的とする菌体と特異的に反応する抗体を作製することができる。

【0027】ここでいう菌体カラムとは、抗原と抗体といった物質間の相互作用（親和性）を利用することにより試料中に含まれる抗体物質を吸着させる方法を意味する。本発明の方法は、抗原抗体反応、即ち、抗原としての菌体と、菌体に反応性を示す抗体との親和性を利用することにより、抗体作製の目的菌体を免疫感作した動物の血清免疫グロブリン分画から得られるポリクローナル抗体から、抗体作製の目的の菌体と近似の形状の菌種に交差反応性を示す抗体を吸収除去するものである。

【0028】菌体カラムは、具体的には、セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のような不溶性担体上に菌体および菌体断片を常法により固定化（物理的吸着、架橋による高分子化、マトリックス中への封印あるいは非共有結合等による固定化）し、該不溶性担体をガラス製、プラスチック製あるいはステンレス製等のカラムに充填することにより作製されるものである。

【0029】本発明の方法に使用される上記不溶性担体としては、菌体または菌体断片を固定化でき得るものであればどのような不溶性担体でも使用できるが、例えば、市販品である、アマシャムファルマシアバイオテク社製のSepharose 2B、Sepharose 4B、Sepharose 6B、CNBr-activated Sepharose 4B、AH-Sepharose 4B、CH-Sepharose 4B、Activated CH-Sepharose 4B、Epoxy-activated Sepharose 6B、Activated thiol-Sepharose 4B、Sephadex、CM-Sephadex、ECH-Sepharose 4B、EAH-Sepharose 4B、NHS-activated SepharoseあるいはThiopropyl Sepharose 6B等、バイオラッド(Bio-Rad)社製のBio-Gel A、Cellex、Cellex AE、Cellex-CM、Cellex PAB、Bio-Gel P、Hydrazide Bio-Gel P、Aminoethyl Bio-Gel P、Bio-Gel CM、Affi-Gel 10、Affi-Gel 15、Affi-Prep 10、Affi-Gel Hz、Affi-Prep Hz、Affi-Gel 102、CM Bio-Gel A、Affi-Gel heparin、Affi-Gel 501あるいはAffi-Gel 601等、和光純薬工業社製のクロマゲルA、クロマゲルP、エンザフィックス P-HZ、エンザフィックスP-SHあるいはエンザフィックスP-AB等、セルバ(Serva)社製のAE-Cellulose、CM-CelluloseあるいはPAB Cellulose等を挙げることができ、これらの中では、CNBr-activated Sepharose 4Bが望ましい。

【0030】例えば、結核菌の場合は、使用できる抗体は、特願2001-72541号にも記載されたミコバクテリウム ツベルクロシス アオヤマB (Mycobacterium tuberculosis Aoyama B、以下、MTABと略する。) で免疫された

ウサギから得られるウサギIgG精製ポリクローナル抗体である抗結核菌ポリクローナル抗体(MTB01R1L/S、(株)日本生物科学センター、)、ミコバクテリウム・カンサシイ(Mycobacterium kansasii、以下、MKと略する。)で免疫されたウサギから得られるウサギIgG精製ポリクローナル抗体である抗抗酸菌(MK)ポリクローナル抗体(MKA01R1L/S、(株)日本生物科学センター)ミコバクテリウム・アビウム・コンプレックス(Mycobacterium avium complex、以下、MACと略する。)で免疫されたウサギから得られるウサギIgG精製ポリクローナル抗体である抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体(MAC01R1L/S、(株)日本生物科学センター)などの市販の抗体を好適に使用することが可能であり、また、上記した抗体作製方法に準じて作製してもよい。

【0031】また、上記した抗結核菌ポリクローナル抗体は、MK及びMACと交差反応を示すものであるが、特願2001-72541号に記載されているように、この交差反応性を示すMK菌体を担持させたMK菌体カラムおよびMAC菌体を担持させたMAC菌体カラムを作製し、抗結核菌ポリクローナル抗体を該各菌体カラムに通し、MK菌体およびMAC菌体に交差反応性を有する抗体を吸収除去することにより、MTABに特異反応性を示す抗体(以下、MTAB特異的抗体と略する。)を調製することができる。このようにして作製された抗体を本発明で使用することができ、これにより、菌種別診断をさらに迅速かつ確実に行なうことができる。

【0032】同様にして、抗抗酸菌(MK)ポリクローナル抗体から、MAC、MTABと反応する抗体を吸収することにより、MKに特異反応性を有する抗体(以下、MK特異的抗体と略する。)が、抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体から、MK、MTABと反応する抗体を吸収することにより、MACに特異反応性を有する抗体(以下、MAC特異的抗体と略する。)が作製できる。

【0033】また、抗原と抗体が反応して形成される免疫複合体検出する方法としては、共雑物質の存在なしで、特異的に抗原を検出できるものであれば、特に制限はないが、特に金コロイド・銀増感法を好適に使用できる。微細な断片として分布する消化断片を金コロイドを利用して検出するのには、目視での判定を容易にすべく銀増感を施す必要がある。したがって、銀増感できるものであれば、いかなる金属コロイドも使用可能である。また、蛍光染色法は、喀痰中には蛍光を発する成分が含まれるため、コンストラクトが悪く、これらの共雑物質と金コロイド修飾された抗体と免疫複合体を形成した菌体断片を特異的に区別して認識することが困難であるので適しない。また、酵素免疫法も同様、小さな断片を目視で判定するには適しないことから、本発明で使用する

ことはできない。

【0034】金コロイドの粒子径としては、保存安定性や調整しやすさの点から、5~10nm程度とする。粒径が小さすぎると、一粒子当りの着色の程度が少ないので発色の程度が悪く、目視確認性が劣るようになる。また粒子が大きすぎると非特異的反応を起こしたりすることがある。

【0035】金コロイドで修飾された抗体の作製方法は、公知であり、市販の金コロイド粒子又は、常法、例えば、Frans等、Nature Phys. Sci., vol. 241 p20-22(1973)記載の方法等従って作製された金コロイド粒子と、目的の抗体とを常法、例えば、Geoghegan and Ackerman, J. Histochem. Cytochem. vol. 25 p1187-1200(1977)に記載の方法等に従って処理することにより、金コロイドで修飾された抗体を作成することができる。

【0036】銀増感には、市販のキットを使用することができ、例えば、Silver Enhancer Kit(Sigma)などが使用される。

【0037】本発明は、また、上記呼吸器感染症の原因菌の免疫学的検出方法に適した呼吸器感染症の診断キットをも提供する。該キットは、呼吸器感染症の原因となる病原菌に特異反応性を有するポリクローナル抗体、もしくは、呼吸器感染症の原因となる病原菌の異なる構成成分をエピトープとして認識するモノクローナル抗体を多数組み合わせたカクテル抗体を必須の構成要素とするものである。該抗体は適当な緩衝液中に溶解させた溶液状および凍結乾燥品でもよく、更に、安定化剤、保存剤等を含ませることができる。

【0038】また、該抗体は、必要に応じて例えば、金コロイド等により修飾され、さらに、銀増感のための手段を含ませることもできる。しかし、これらは市販品を好適に利用することが可能であるから、必須の構成要素ではない。

【0039】

【実施例】実施例を挙げて本発明を詳述するが、本発明は従来、着目されていなかった菌体の消化断片を診断のターゲットとしたことに意義があり、次の実施例に限定されるものではない。以下、検体として喀痰を用い、金コロイド修飾した抗結核ポリクローナル抗体と反応させ、銀増感させることにより、結核菌の診断を行なった例を詳細に説明する。

【0040】〔実施例1〕

金コロイド修飾抗結核ポリクローナル抗体の調製

50μlの0.02Mリン酸緩衝液(pH7.3)に溶解した1mgの抗結核菌ポリクローナル抗体(MTB01R1L/S、(株)日本生物科学センター)に、100μlの金コロイド溶液(GOLD COLLOID

5NM、SIGMA)を添加して混合し、4℃で12～16時間、静置させて標識した。標識後、限界透過膜(ULTRAFREE、MILLIPORE)で0.02%NaN₃PBS(－)にバッファーを交換した後、100μlに濃縮した。

【0041】〔実施例2〕

結核菌の検出

【0042】検体として、結核が疑われる被検者13例から採取した喀痰を用いた。被検者から採取した喀痰を火炎滅菌した白金耳でぬぐい取り、スライドグラス上に塗抹した後、火炎固定を行なった。

【0043】まず、チールーネールゼン染色法による結核診断を行なった。上記スライドグラスに、石炭酸フクシン液を滴下し、5分間60℃で加温した後、流水にて水洗し、3%塩酸アルコールで脱色した後、流水にて水洗し、メチレンブルーに10秒間、反応させ、流水にて水洗を行なった。このスライドグラスを風乾後、光学顕微鏡にて染色の有無を観察すると共に、ガフキー号数を用いて判定した。

【0044】次に抗体染色および銀増感を行なった。次に、このチールーネールゼン染色法による診断を行なったスライドグラスを、0.01% Tween 20含有0.05M TRIS-HCl緩衝液(pH7.6)にて5分間浸漬した後、ウサギ正常イムノグロブリン分画(Immunoglobulin Fraction, Normal rabbit, Dako)を滴下し30分間反応させることにより、ブロッキングを行なった。このスライドグラスを0.01% Tween 20含有0.05M TRIS-HCl緩衝液(pH7.6)で5分間、3回洗浄した後、同じ緩衝液で、200倍に希釈した実施例1で調製された金コロイド修飾抗結核ウサギポリクローナル抗体を、同じサンプルに滴下し、60

分間反応させた後、水洗し、市販の銀増感キットSilver Enhancer Kit (Sigma)を用いて製造業者の指示に従い、増感した。銀増感は具体的には、使用直前にSolution A及びBを混合し、混合して得られる混合液をスライドグラスに滴下し、観察しながら適切な濃さまで増感した後、水洗し、固定液に2分間浸漬した後、水洗を行なった。このスライドグラスをGel Mountで封入し、光学顕微鏡にて400倍の倍率で銀増感によって得られた銀粒子をカウントした。なお、観察された粒子の数が0.13mm²に20個以下であれば陰性(－)、50個以上であれば陽性(＋)、21～49個であれば擬陽性(＋－)と判定した。以上は全て室温で行なった。

【0045】比較例として、上記喀痰についてPCR法による結核診断を行なった。PCR法は市販のアンプリコア TB (ロッシュ)を用いて行なった。

【0046】結果を、表1にまとめるとともに、図1～図3に検体番号3、6および11の金コロイド・銀増感法による顕微鏡像の写真を示す。検体3はチールーネールゼン染色法およびPCRでは、結核菌が検出されなかった例であり、本発明の方法によっても陰性であるとの判断がされたものである。また、検体6はチールーネールゼン染色法によっては結核菌が検出されなかったが、PCRでは、結核菌が検出された例であり、本発明の方法によっても陽性であるとの判断がされたものである。検体11は、チールーネールゼン染色法によって結核菌が検出され、PCRを行なうまでもなく、結核であると判断された例であり、本発明の方法によっても陽性であるとの判断がされたものである。

【0047】

【表1】

検体番号	ZN 染色	ガフキー	PCR	抗体染色	粒子の数
1	－		－	－	12
2	－		－	－	5
3	－		－	－	4
4	－		－	－	4
5	－		＋	＋	707
6	－		＋	＋	378
7	－		＋	＋	872
8	＋		＋	＋	54
9	＋		＋	＋	118
10	＋	G4		＋	1319
11	＋	G4		＋	1694
12	＋	G7		＋	205
13	＋	G3		＋	703

【0048】以上の結果から、PCR法と同程度の感度を有することが理解される。また、チールーネールゼン染色法による診断が行なわれたサンプルを使用することができ、また、チールーネールゼン染色法による診断よりも感度良く結核菌を検出できることが理解される。

【0049】〔実施例3〕次に、本発明で好適に利用できる菌種別抗体の作製の具体例を説明する。これら抗体

も、本発明の呼吸器感染症の原因菌検出方法および呼吸器感染症の診断キットに使用できる。

【0050】MTAB特異的抗体の作製

1. まず、MKに交差反応性を有する抗体を除去するために用いるMKの菌体および菌体断片が担持されたMK菌体カラムを作製した。

(1) 湿重量400mgのMK(ATCC No. 12

478)の加熱死菌をカップリングバッファー(0.1 M 炭酸水素塩バッファー(pH8.3)+0.5 M NaCl)4 mLに懸濁し、超音波洗浄機内で15~60分超音波処理することで、均一化し、菌体処理溶液を得た。

(2) CNBr-activated Sepharose 4B(アマシャムファルマシアバイオテク)1 gを1 mM HClに15分間膨潤させた。

(3) (2)で膨潤させたCNBr-activated Sepharose 4BをPD-10カラム(アマシャムファルマシアバイオテク)に充填し、1 mM HCl 50 mL、前記カップリングバッファー50 mLを用いてこの順で洗浄した。

(4) (3)のカラムに(1)で作製した菌体処理溶液を加え、室温で16時間、ローテーターで反応させた。

(5) (4)のカラムをカップリングバッファー20 mL、ブロッキングバッファー(0.2 M グリシンバッファー(pH8.3))10 mLを用いてこの順で洗浄した後、このカラムをブロッキングバッファーで満たし、室温で2時間反応させた。

(6) カップリングバッファー30 mL、洗浄バッファー(0.1 M 酢酸バッファー((pH4.0)+0.5 M NaCl)30 mL、溶出バッファー(0.1 M グリシンバッファー(pH2.5))30 mL、結合バッファー(PBS(-))30 mLでこの順で洗浄した。

(7) 結合バッファーでカラムを満たし、使用時まで4℃で保存した。

【0051】2. MAC菌体カラムの作製

MAC抗体を吸収するMAC菌体カラムを、MK加熱死菌の代わりに、MAC(ATCC No. 19078)加熱死菌を用いることを除いて上記と同様の方法により作製した。

【0052】3. 次に、抗結核菌ポリクローナル抗体に吸収処理を行い、MTAB特異的抗体、即ち、MK及びMACと交差反応を示さず、MTABと特異的に反応する抗体を以下の手順により作製した。

(1) 抗結核菌ポリクローナル抗体(MTB01R1L/S、(株)日本生物科学センター)10 mgをPBS(-)に置換した。

(2) 上記1に記載の方法で作製されたMK菌体カラム(3.5 mL)をPBS(-)で平衡化しておき、

(1)の抗結核菌ポリクローナル抗体/PBS溶液を、前記MK菌体カラムに流速0.6 mL/分の条件で通した。

(3) 前記MK菌体カラムを通過した蛋白画分を回収した。

(4) 上記2に記載の方法で作製されたMAC菌体カラム(3.5 mL)をPBS(-)で平衡化しておき、

(3)で回収された蛋白画分を再度前記MAC菌体カラムに通した。

(5) 前記MAC菌体カラムを通過した蛋白画分を回収

した。

(6) (5)で回収された蛋白画分を限外濾過膜(分画分子量50000)を用いて濃縮し、MTAB特異的抗体を得た。

【0053】尚、上記例では、吸収処理をMK菌体カラムを使用した後にMAC菌体カラムを使用したか、MAC菌体カラムを使用した後にMK菌体カラムを使用してもよい。

【0054】4. 抗結核菌ポリクローナル抗体の吸収処理抗体と未吸収処理抗体のMK及びMACとの交差反応性を調べることにより、抗結核菌ポリクローナル抗体の吸収処理抗体と未吸収処理抗体の性能比較を行なった。

【0055】抗結核菌ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体は、採血時点の抗体価は、菌体に25600(Abs. 0.659)であった。抗結核菌ポリクローナル抗体の吸収処理抗体は、上記3で得られたMTAB特異的抗体である。

【0056】検討はELISA法の間接法により行なった。

(1) PBSで懸濁した100 mg/mLのMTAB(ATCC No. 31726)、MK、MACの各加熱死菌をコーティングバッファーで100 µg/mL(pH9.6)に調製した後、各死菌体を、それぞれのマイクロプレートの各ウェルに60 µL分注し、37℃で1.5時間インキュベートしてウェルに吸着させた。これらプレートは使用直前に液を廃棄し、プレートウォッシャーで2回洗浄後、更にブロッキング溶液を各ウェルに160 µL分注し、37℃で1時間インキュベートした。

(3) 前記各ウェルのブロッキング溶液を廃棄し、プレートウォッシャーで3回洗浄した。

(4) 一次抗体として、前記抗結核菌ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体と前記抗結核菌ポリクローナル抗体の吸収処理抗体を使用した。これら抗体を検体希釈液で100 µg/mLから2×10⁻⁷まで2倍段階希釈し、前記抗結核菌ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体のそれぞれの段階希釈液と、前記抗結核菌ポリクローナル抗体の吸収処理抗体のそれぞれの段階希釈液とをマイクロプレートに各ウェルに80 µLずつ分注し、37℃で1時間インキュベートした。

(5) インキュベート後、反応液を廃棄し、プレートウォッシャーで3回洗浄した。

(6) 二次抗体として、ビオチン標識した抗ウサギIgG抗体溶液を各マイクロプレートの各ウェルに80 µL分注し、37℃で1時間インキュベートする。

(7) 二次抗体の反応が終了したプレートをプレートウォッシャーで洗浄した後、酵素基質を各マイクロプレートの各ウェルに80 µL分注し、反応開始より30分後に、波長405 nmにおける吸光度をプレートリーダーにて測定した。対象検体とコントロールの吸光度差が

0.1以上をクリアーする最高希釈倍率をもって未吸収処理抗体および吸収処理抗体の性能を比較した。尚、上記各試薬の組成を表2に示した。

【0057】

【表2】20xコーティングバッファー

Na ₂ CO ₃	1.272 g
NaHCO ₃	2.344 g
NaN ₃	0.160 g
ミリQ水で40 mlに定容	
25xPBS (-)	
KCl	5g
KH ₂ PO ₄	5g
Na ₂ HPO ₄	72.5g
NaCl	200g

酵素基質 (AP用) : p-Nitrophenylphosphate disodium salt	100 mg
0.5mM MgCl ₂ 溶液	100 ml
Diethanolamine	100 μl

【0058】抗結核菌ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体は、各死菌体の力価を比較することにより、前記MTAB死菌体との反応性に対して、前記MK死菌体と25% (2560/10240)、前記MAC死菌体と50% (5120/10240)の交差反応性を有していた。一方、前記抗結核菌ポリクローナル抗体の吸収処理抗体は、各死菌体の力価を比較すると、MTAB死菌体との反応に対して、前記MK死菌体が0.4% (20/5120)、前記MAC死菌体が0.2% (10/5120)という値にすぎなかった。これにより、上記3.で作製されたMTAB特異的抗体はMK及びMACに対する交差反応性を有さず、MTABと特異的に反応する抗体であることが確認された。

【0059】〔実施例4〕

MK特異的抗体の作製

1. MATB菌体カラムの作製

MATBに反応するMATB抗体を吸収するMATB菌体カラムを、MAC加熱死菌の代わりに、MATB (ATCC No. 31726) 加熱死菌を用いることを除いて実施例3に記載の方法と同様の方法により作製した。

【0060】2. 抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の吸収処理

抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体 (MKA01R1L/S、(株)日本生物科学センター) からMTABと反応する抗体及びMACと反応する抗体を吸収処理することにより、MTAB及びMACと交差反応を示さず、MKと特異的に反応する抗体、即ち、MK特異的抗体を取得した。抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の吸収処理は、上記抗結核菌ポリクローナル抗体の吸収処理の方法において、MK菌体カラムとMAC菌体カラムとを組み合わせる代わりに、上記1.で作製したMTAB菌体カラムと実施例3で作製したMAC菌体カラムとを組

ミリQ水で1000mLに定容

洗浄液

25xPBS (-)	400 ml
Tween 20	10 ml
NaN ₃	10 g

ミリQ水で10Lに定容

ブロッキング溶液

Geratin	10 g
25xPBS (-)	40 ml
NaN ₃	1 g

ミリQ水で1000mLに定容

温水中で加温しGeratinを溶かす

検体希釈液 ブロッキング溶液を洗浄液にて10倍希釈する。

み合わせること除いて、前記方法に準じて行った。

【0061】3. 抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の吸収処理抗体と未吸収処理抗体のMTAB及びMACとの交差反応性を調べることにより抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の吸収処理抗体と未吸収処理抗体の性能比較を行なった。

【0062】抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体は、採血時点の抗体価は、菌体に25600 (Abs. 1.119)であった。

抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の吸収処理抗体は、上記2で得られたMK特異的抗体である。

【0063】抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の吸収処理抗体と未吸収処理抗体の吸光度の測定はELISA法を用いて行い、抗体の力価を求めた。

実験手順は、各死菌体のウェルへの吸着条件を4℃で16時間静置とし、一次抗体として前記抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体と前記MK特異的抗体を用いたことを除いて、上記実施例3に記載の方法に準じて行った。

【0064】前記抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体は、各死菌体の力価を比較することにより、前記MK死菌体との反応性に対してMTAB死菌体と前記MAC死菌体共に12.5% (5120/40960)の交差性を有していた。一方、前記抗抗酸菌 (MK) ポリクローナル抗体の吸収処理抗体は、各死菌体の力価を比較すると、前記MTAB死菌体が0.8% (80/10240)、前記MAC死菌体が0.1% (10/10240)という値にすぎなかった。これにより、上記3で作製された、前記MK特異的抗体は、MTAB及びMACに対する交差性は、ほとんど認められず、MKと特異的に結合する抗体であることが確認された。

【0065】〔実施例5〕

MAC特異的抗体の作製

1. 抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の吸収処理
抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体(MAC01R1L/S、(株)日本生物科学センター)からMTABと反応する抗体及びMKと反応する抗体を吸収処理することにより、MTAB及びMKと交差反応を示さず、MACと特異的に反応する抗体、即ち、MAC特異的抗体と略する。)を取得した。抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の吸収処理は、実施例3に記載の方法において、MK菌体カラムとMAC菌体カラムとを組み合わせる代わりに、MTAB菌体カラムとMK菌体カラムとを組み合わせることを除いて、前記方法に準じて行った。

【0066】2. 抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の吸収処理抗体と未吸収処理抗体のMTAB及びMKとの交差反応性を調べることにより、抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の吸収処理抗体と未吸収処理抗体の性能比較を行なった。

【0067】抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体は、採血時点の抗体価は、菌体に25600(Abs. 0.776)であった。

抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の吸収処理抗体は、上記1で得られた抗MAC特異的抗体である。

【0068】実験手順は、各死菌体のウェルへの吸着条件を4℃で16時間静置とし、一次抗体として前記抗MACウサギIgG未吸収処理抗体と前記抗MACウサギIgG吸収処理抗体を用いたことを除いて、実施例3に記載の方法に準じて行った。

【0069】前記MAC死菌体と同程度の吸光度(0.118)に達する力価とを比較すると、前記抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体は、前記MTAB死菌体と12.5%(2560/2048

0)、前記MK死菌体と50%(10240/20480)の交差性を有していた。これより、前記抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の未吸収処理抗体においては、前記MTAB死菌体及び前記MK死菌体に対する交差性が認められた。一方、前記抗抗酸菌(MAC)ポリクローナル抗体の吸収処理抗体は、各死菌体の力価を比較すると、MAC死菌体との反応性に対して、前記MTAB死菌体が0.8%(20/2560)、前記MK死菌体が0.4%(10/2560)にすぎなかった。これにより、1.で作製されたMAC特異的抗体はMTAB及びMKに対する交差性は、ほとんど認められず、MACと特異的に反応する抗体であることが確認された。

【0070】

【発明の効果】本発明は、迅速、簡便かつ高感度な呼吸器感染症の診断が可能となる呼吸器感染症の原因菌検出方法および呼吸器感染症の診断キットを提供するものである。したがって、呼吸器感染症診断において、広範な適用が期待され、呼吸器感染症の診断、呼吸器感染症の早期治療へ大きな貢献を果たすものである。特に結核菌診断の場合、結核の診断において、最も汎用されているチール・ネールセン染色法により染色されたサンプルをそのまま利用することができるので、再度のサンプル調製が必要ないので、経済的にも優れている。

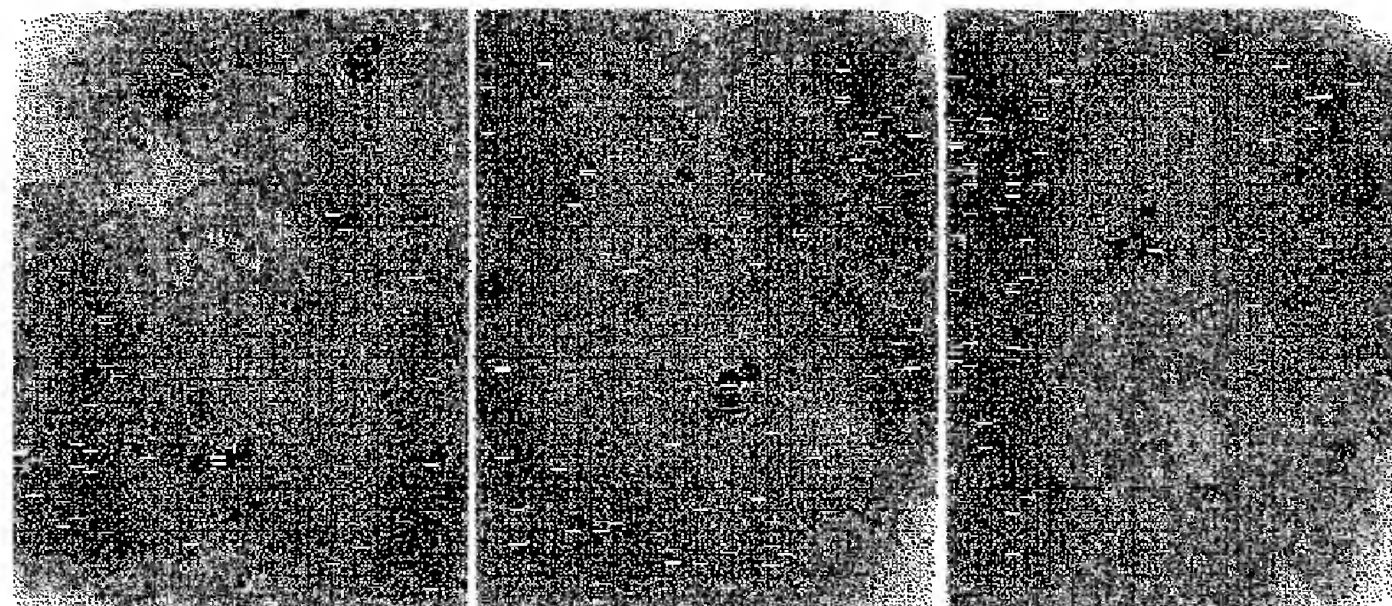
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の呼吸器感染症の原因菌検出方法により、診断された検体3の顕微鏡像を示す図。

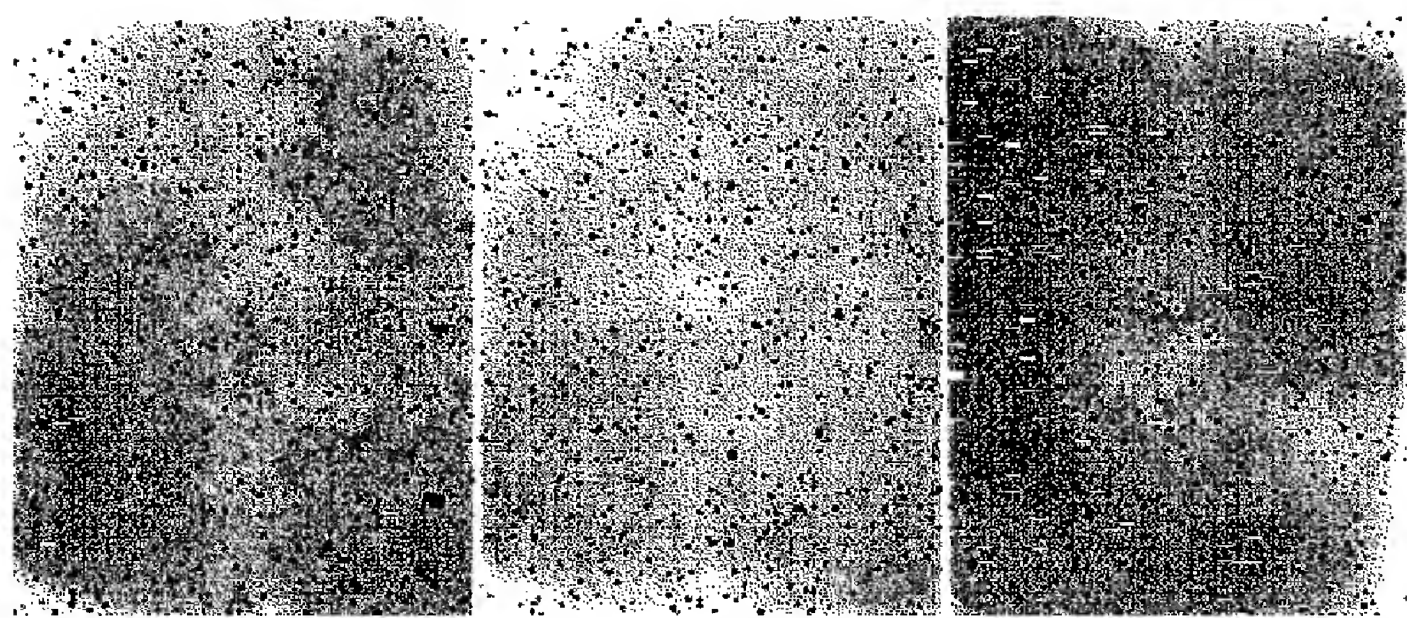
【図2】本発明の呼吸器感染症の原因菌検出方法により、診断された検体6の顕微鏡像を示す図。

【図3】本発明の呼吸器感染症の原因菌検出方法により、診断された検体11の顕微鏡像を示す図。

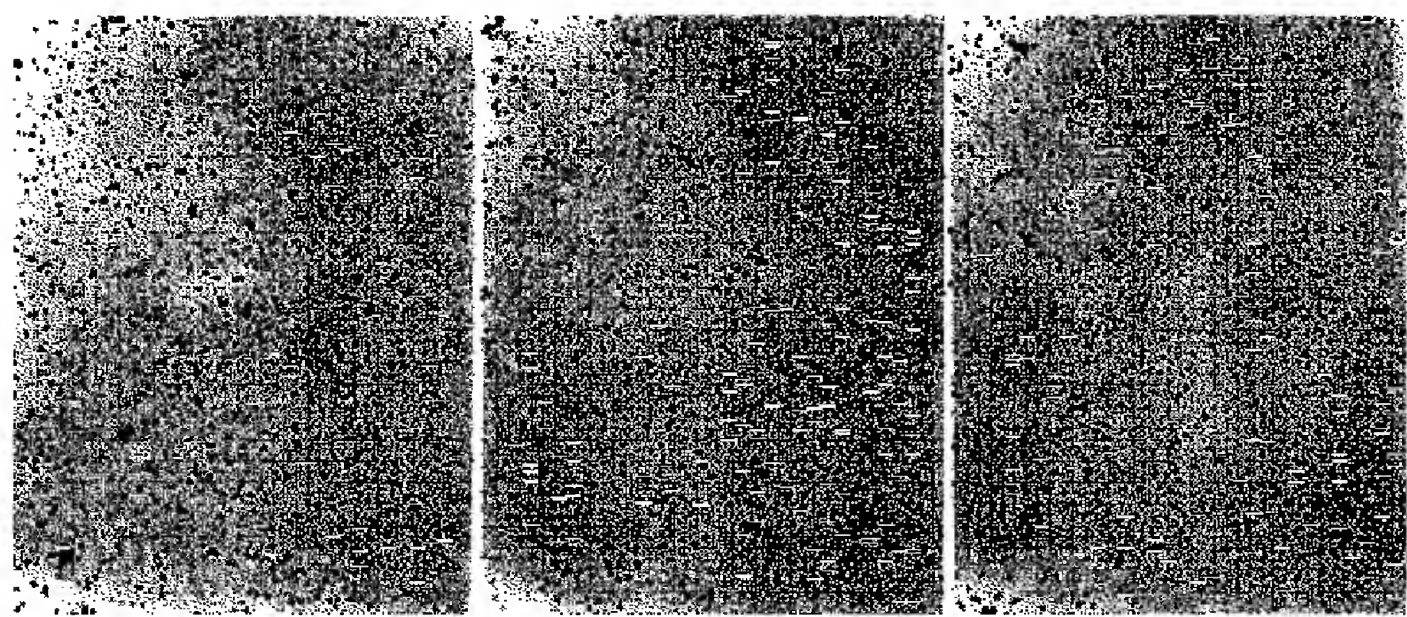
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 中島 理晴
岐阜県海津郡海津町立野字一色461-1
株式会社日本生物科学センターバイオ事業
部内

(72)発明者 佐守 友博
京都府久世郡久御山町大字大橋辺小字大橋
辺16番地10 株式会社日本医学臨床検査研
究所内

Fターム(参考) 2G045 AA28 BA11 BB50 CB08 DA77
FA18 FB03 FB11
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ06
QR48 QS03 QS11 QS33 QS36
QX02

DIAGNOSTIC METHOD OF RESPIRATORY TRACT INFECTION UTILIZING DIGESTION FRAGMENT OF CAUSATIVE FUNGUS IN SPUTUM

Publication number: JP2002372531 (A)

Publication date: 2002-12-26

Inventor(s): NAKAJIMA MICHIHARU; SAMORI TOMOHIRO

Applicant(s): NIPPON SEIBUTSU KAGAKU CT KK; JAPAN CLINICAL LAB INC

Classification:

- international: G01N33/50; C12Q1/04; G01N33/53; G01N33/569; G01N33/50; C12Q1/04; G01N33/53; G01N33/569; (IPC1-7): G01N33/50; C12Q1/04; G01N33/53; G01N33/569

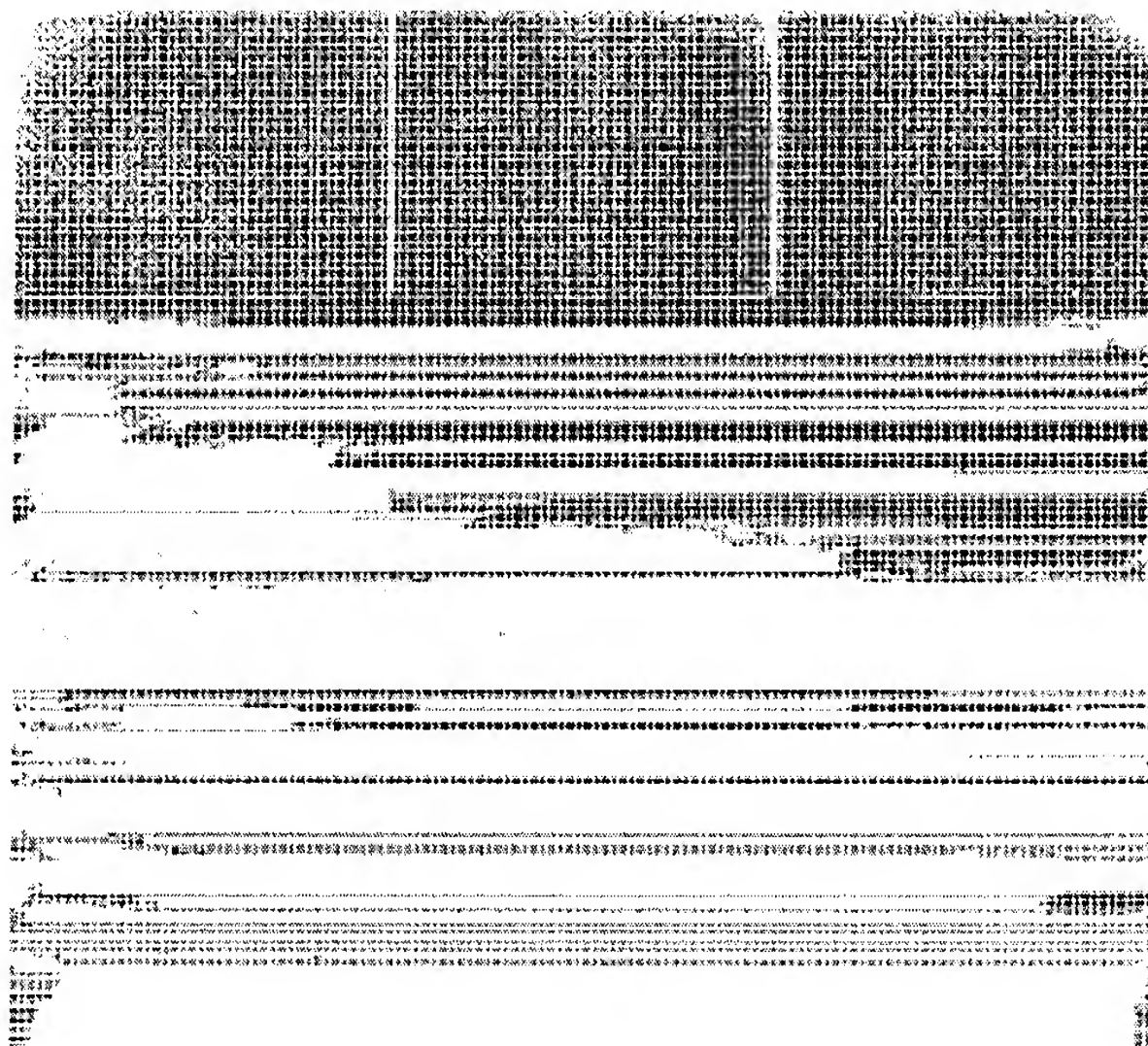
- European:

Application number: JP20010157574 20010525

Priority number(s): JP20010157574 20010525

Abstract of JP 2002372531 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To establish an immunological detection method capable of detecting, quickly and simply, causative fungus of a respiratory tract infection including tuberculosis, which is desired on a field of medical treatment.
SOLUTION: As the result of earnest and repeated research, it is found out that the causative fungus of the respiratory tract infection can be detected simply, quickly and surely, which has been impossible by a conventional method, by identifying digestion fragments included in large quantities in sputum of a respiratory tract infection patient by paying attention to existence of the digestion fragments of the causative fungus which has not been noted by the conventional method.



Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide